

На правах рукописи

МИСЮРИН ВСЕВОЛОД АНДРЕЕВИЧ

**PRAME – ДРАЙВЕРНЫЙ БЕЛОК КАНЦЕРОГЕНЕЗА И МИШЕНЬ
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович)

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор **Киселевский Михаил Валентинович**

Официальные оппоненты:

Киселёв Сергей Львович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией эпигенетики федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей генетики им Н.И. Вавилова» Российской академии наук

Титов Константин Сергеевич, доктор медицинских наук, заведующий отделением опухолей кожи и мягких тканей государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова» Департамента здравоохранения города Москвы

Рукавицын Олег Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, начальник гематологического центра федерального государственного бюджетного учреждения «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «03» марта 2022 года в 13 - 00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01 (Д 001.017.01), созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115478, г. Москва, Каширское шоссе, д.23).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115522 г. Москва, Каширское шоссе, д.24) и на сайте www.ronc.ru

Автореферат разослан «.....».....2021 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень её разработанности

Опухолевая клетка характеризуется множеством нарушений, проявляющихся в виде особенностей иммунофенотипа, аберрантно-экспрессируемых внутриклеточных белков, мутаций или химерных структур, а также утратой регуляторных белков. Их число постепенно увеличивается вследствие генетической нестабильности, а также воздействия химиопрепаратов и лучевой терапии. Ключевые дефекты называются драйверами канцерогенеза [Liang et al. 2012].

Теория драйвера связывает трансформацию клеток с дефектами так называемых драйверных генов. Согласно этой теории, возникновение опухоли происходит вследствие ряда специфических геномных изменений, которые последовательно вызывают метаболические и функциональные нарушения в соматических клетках [Liang et al. 2012].

Выделяют четыре базовых уровня, на которых могут возникнуть эти изменения. Первый уровень – метилирование регуляторных областей гена. Изменение уровня метилирования может наблюдаться по всему геному, однако наиболее значимые последствия будет иметь при деметилировании онкогенов и метилировании генов, кодирующих супрессоры опухоли, что опосредует пролиферацию и генетическую нестабильность опухолевой клетки [Ozdemir et al. 2012]. Второй уровень связан с изменением профиля экспрессии микроРНК. Поскольку микроРНК регулируют активность множества генов путём сайленсинга и посттрансляционных изменений, нарушения в их собственном профиле экспрессии связаны с дисфункциями регуляторных генов. По этим причинам микроРНК способны участвовать в онкогенезе [Xiong et al. 2010]. Третий уровень – наличие мутаций в ряде значимых генов. Ряд генов, таких как *TP53* и *KRAS*, способен становиться драйверами вследствие появления мутаций, меняющих структуру и свойства белков, кодируемых ими. В мировой литературе именно мутации чаще всего упоминаются как драйверы [Pitolli et al. 2019].

Мутации могут появляться не только в экзонах генов, но также в регуляторных областях, таких как промоторы и энхансеры. Зачастую меняется уровень экспрессии генов, контролируемых мутировавшими регуляторными областями, что приводит к изменению количества мРНК и кодируемого ею белка [Fredriksson et al. 2014]. Любой из представленных дефектов может считаться драйверным, если придаёт селективные преимущества опухолевой клетке.

Результаты многочисленных экспериментальных исследований и собственный опыт позволили предположить, что раково-тестикулярный белок PRAME, активный в опухоли и не экспрессирующийся в нетрансформированной соматической клетке, также обладает свойствами, позволяющими рассматривать его как драйверный белок [Yan et al. 2015; Costessi et al. 2011; Carvalho et al. 2010; Tanaka et al. 2011; Zhu et al. 2018; Pierron et al. 2014; Watari et al. 2000; Oehler et al. 2009; Pas et al. 2012; Pan et al. 2017; Gudas et al. 2011; Bullinger et al. 2013; Epping et al. 2007; Liu et al. 2018; Coussens et al. 2018; Munn et al. 2018; Saldanha-Araujo et al. 2010; Al-Khadairi et al. 2019; Plones et al. 2017; Nettersheim et al. 2016; Roszik et al. 2017].

Исследования свойств белка PRAME осложняются тем, что у него нет ферментативного центра, он не входит в состав цитоскелета и не способен напрямую взаимодействовать с ДНК [Costessi et al. 2012]. Несмотря на это, белок участвует в формировании некоторых комплексов, в том числе вместе с убиквитинлигазой Cull2, перерабатывающей лишние или повреждённые белки, транскрипционного комплекса белков. Поэтому сложно объяснить, чем обусловлено ухудшение прогноза у PRAME-экспрессирующих пациентов с онкологическими заболеваниями. Однако снижение времени выживаемости и химиорезистентность во многих случаях связана с активностью в опухоли белка PRAME [Yan et al. 2015].

PRAME может рассматриваться не только как драйвер канцерогенеза, но и как терапевтическая мишень. Такая возможность иллюстрируется несколькими примерами. Известно, что основной особенностью хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), является химерный белок BCR-ABL. Этот химерный белок

представляет собой одновременно главный маркер заболевания, драйвер лейкемогенеза и мишень для ингибиторов тирозинкиназ (ИТК). Именно поэтому обнаружение транскриптов гена *BCR-ABL* и определение спектра его мутаций становится основанием для применения ИТК, таких как иматиниб, понатиниб и другие [Radich et al. 2006]. Зачастую эти препараты, применяемые в монорежиме, позволяют достигнуть не только подавления роста опухоли, но также полностью излечить больного.

Однако в случае *PRAME* не разработана стратегия таргетной терапии. В отличие от *BCR-ABL*, *PRAME* не имеет известной структурной особенности, на которую можно было бы воздействовать при помощи малой молекулы. По этой причине необходимо продолжить исследования структуры гена *PRAME*, оценить взаимодействие белка *PRAME* с другими белками, а также проверить возможность воздействия иммунопрепаратов на клетку, экспрессирующую *PRAME*.

Несмотря на незавершённость представлений о функциях белка *PRAME*, уже сейчас можно оценить перспективы *PRAME*-направленной терапии. Накопленные данные свидетельствуют о том, что экспрессия *PRAME* в опухолевых клетках наблюдается часто. В ряде онкологических заболеваний она имеет место практически в 100% случаев. Поскольку любой белок и кодирующий его ген имеют уникальные последовательности аминокислот или нуклеотидов, это позволяет разрабатывать соединения, способные с ним связываться и блокировать его функции. Так как наличие *PRAME* в опухоли связано с неблагоприятным клиническим исходом, разработка методов таргетной терапии становится особенно актуальной. При этом есть основания предполагать, что разработанные методы будут относительно безопасны для самого больного, так как в его здоровых клетках *PRAME* не активен [Мисюрин. 2018].

Общий объём исследований, затрагивающих различные аспекты клинического и биологического значения экспрессии *PRAME*, достаточно велик. Однако многие аспекты данной проблемы далеки от разрешения, а имеющиеся данные во многом противоречивы.

Цель исследования

Изучение PRAME как драйверного белка канцерогенеза и мишени противоопухолевой терапии.

Задачи исследования

1. Доказать драйверные свойства белка PRAME на модели неопухолевой клеточной линии.
2. Охарактеризовать прогностическое значение экспрессии *PRAME* при солидных опухолях и лимфопролиферативных заболеваниях.
3. Определить транскрипционные факторы, регулирующие активность гена *PRAME*.
4. Разработать антисенс-олигонуклеотиды для инактивации транскрипционных факторов, активирующих ген *PRAME*.
5. Оценить влияние бортезомиба и противоопухолевых цитостатиков на выживаемость клеточных линий меланомы, рака лёгких, рака молочной железы и рака толстой кишки.
6. Оценить эффективность анти-PRAME антитела на модели *PRAME*-экспрессирующих ксенографтов.

Методология и методы исследования

Проводились эксперименты на клеточных опухолевых линиях A875, SKBR-3, A549, HCT-116 и ряда линий меланомы серии mel. Для исследования драйверных свойств PRAME была создана модель, в которой неопухолевая линия WI-38 была трансфицирована вектором для экспрессии *PRAME*. В работе с линиями использовались методы МТТ, количественной ПЦР в реальном времени и анализ экспрессии генов на микрочипах.

Оценка противоопухолевого эффекта PRAME-распознающих мышинных и химерных антител проводилась на ксенографтных моделях. Проводилось исследование скорости торможения роста опухоли.

В исследование включены данные об экспрессии *PRAME* у 9135 больных с различными диагнозами. Были доступны подробные клинические данные

больных с диагнозом фолликулярная лимфома (ФЛ, n=34) и больных Т-клеточными лимфопрлиферативными заболеваниями (Т-кЛ, n=36).

Биоинформатические исследования проводились методами выравнивания генетических последовательностей и картирования генов. Для анализа данных выживаемости больных использовался лог-ранговый критерий. Для анализа связи активности *PRAME* и других клинических признаков использовались такие подходы как кластеризация данных, применение критерия Уилкоксона для связанных и критерия Манна-Уитни для несвязанных выборок, а также другие статистические критерии.

Научная новизна

Впервые продемонстрированы драйверные свойства гена *PRAME* на модели неопухолевой диплоидной клеточной линии фибробластов человека WI-38, трансфицированных вектором для экспрессии *PRAME*. Установлено, что высокий уровень экспрессии *PRAME* коррелирует со снижением параметров как общей, так и бессобытийной выживаемости при аденокарциноме, раке молочной железы, раке толстого кишечника, плоскоклеточном раке головы и шеи, светлоклеточной карциноме почки, аденокарциноме и плоскоклеточном раке лёгкого, аденокарциноме поджелудочной железы, меланоме кожи и раке эндометрия.

Установлена корреляция между выявлением опухолевых клеток в биологических образцах больных ФЛ и Т-кЛ с экспрессией *PRAME*, а также прямая зависимость между уровнем экспрессии *PRAME* и величиной индекса Ki-67. Таким образом, определение экспрессии *PRAME* может служить дополнительным маркером диссеминации и пролиферативной активности лимфатической опухоли.

Получены новые данные, характеризующие прямую связь между уровнем экспрессии *PRAME* и химиорезистентностью и роль транскрипционного фактора RNF8 в экспрессии *PRAME*. Разработан антисмысловый олигонуклеотид для

блокирования экспрессии мРНК *PHF8*, результатом чего становится снижение уровня экспрессии *PRAME*.

Впервые установлено синергичное цитотоксическое воздействие бортезомиба с цисплатином, цитарабином, доксорубицином, мелфаланом и циклофосфамидом по отношению к *PRAME*-экспрессирующим линиям опухолевых клеток.

Разработан препарат химерных моноклональных антител для терапии *PRAME*-позитивных онкологических заболеваний.

Теоретическая и практическая значимость

Продемонстрирована возможность нокаута транскрипционного фактора *PHF8*, активирующего экспрессию *PRAME*, что делает опухолевые клетки меланомы менее устойчивыми к терапии цисплатином. Данная информация может использоваться как обоснование для разработки новых препаратов для инактивации *PHF8*, которые могут иметь значимый терапевтический эффект.

Полученные данные позволяют выделить прогностически наиболее неблагоприятную группу больных ФЛ, и использовать международный прогностический индекс FLIP1 с большей точностью.

Бортезомиб может быть рекомендован в клиническую практику для увеличения чувствительности *PRAME*-экспрессирующих опухолей к таким химиопрепаратам как цисплатин, цитарабин, доксорубицин, мелфалан и циклофосфамид.

Разработанное химерное *PRAME*-распознающее антитело 6H8 представляет практический интерес для терапии *PRAME*-экспрессирующих опухолей.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ литературы по тематике исследования, разработан дизайн экспериментов, набран лабораторный материал, проведены эксперименты и измерения и выполнен статистический анализ. Автор принимал непосредственное участие в дизайне химерных *PRAME*-распознающих антител.

Соответствие паспорту специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия («Биологические науки»).

Положения, выносимые на защиту

1. Ген *PRAME* человека обладает свойствами драйвера онкогенеза, которые проявляются как в трансфицированной клетке WI-38, так и в опухолевой.
2. Снижение времени выживаемости больных онкологическими заболеваниями и уменьшение результативности терапии коррелирует с высоким уровнем экспрессии *PRAME*.
3. Ингибитор протеасом бортезомиб позволяет обратить последствия экспрессии *PRAME* в опухолевой клетке.
4. Мышиные и химерные *PRAME*-распознающие антитела обладают противоопухолевым эффектом в условиях *in vivo*.

Внедрение результатов исследования

Основные положения научной работы представлены на научных конференциях в России и за рубежом, в том числе на 19th Congress of the European Nematology Association (Милан, 2014); XI Российской конференции с международным участием «Злокачественные лимфомы» (Москва, 2014); Научной Сессии НИЯУ МИФИ «Наноматериалы для терапии, диагностики и мониторинга результатов лечения» (Москва, 2015); VII Съезде Российского общества медицинских генетиков, (Санкт-Петербург, 2015); XIX Российском онкологическом конгрессе, (Москва, 2015); III конгрессе гематологов России, Москва, (Москва, 2016); XI и XII Всероссийской научно-практической конференции «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике», (Москва, 2014 и 2015); XIII и XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова, (Москва, 2016 и 2017); Конференции с международным участием «Меланома и опухоли кожи», (Москва, 2018); IV, V и VI Петербургском онкологическом Форуме «Белые ночи» Санкт-Петербург, 2018,

2019 и 2020); I, II, III, IV и V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2015, 2016, 2017, 2018 и 2019); Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2019", (Москва, 2019).

Апробация

Апробация диссертации состоялась 7 июля 2020 года на совместной научной конференции лаборатории химико-фармацевтического анализа, лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, лаборатории рекомбинантных опухолевых антигенов, лаборатории комбинированной терапии опухолей, лаборатории разработки лекарственных форм, лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза, лаборатории иммунофармакологии, лаборатории онкогеномики, лаборатории механизмов регуляции иммунитета и лаборатории клеточного иммунитета ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них – 10 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК перечнем Минобрнауки России.

Объём и структура работы

Диссертация изложена на 228 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 21 таблицей и 69 рисунками. Список литературы представлен 300 источниками (22 — отечественными; 278 — зарубежными).

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Проводились биоинформатические, культуральные, лабораторные, исследования *in vivo*, а также анализ клинико-лабораторных характеристик

больных онкологическими и онкогематологическими заболеваниями. Для анализа данных использовались различные статистические критерии.

Биоинформатический анализ проводился с привлечением данных ресурса GEPiA для оценки влияния экспрессии *PRAME* на общую (ОВ) и бессобытийную выживаемость (БСВ) больных онкологическими заболеваниями. Были проанализированы данные 9065 больных со следующими диагнозами: аденокортикальный рак (АКР, n=77), рак мочевого пузыря (РМП, n=400), инвазивный рак молочной железы (РМЖ, n=1066), плоскоклеточный рак шейки матки и эндоцервикальная аденокарцинома (АКШМ, n=292), холангиокарцинома (ХК, n=36), рак толстой кишки (РТК, n=270), диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДБКЛ, n=46), рак пищевода (РП, n=182), мультиформная глиобластома (МГ, n=156), плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ, n=518), хромофобный рак почки (ХРП, n=58), папиллярный рак почки (ПРП, n=517), светлоклеточная карцинома почек (СККП, n=283), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ, n=106), глиома головного мозга (ГГМ, n=514), гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК, n=354), аденокарцинома легкого (АЛ, n=476), плоскоклеточный рак легкого (ПРЛ, n=383), мезотелиома плевры (МП, n=81), серозная цистаденокарцинома яичника (СЦАК, n=425), аденокарцинома поджелудочной железы (АКПЖ, n=178), рак предстательной железы (РПЖ, n=469), колоректальный рак (КР, n=90), саркомы мягких тканей (СМТ, n=256), меланома кожи (МК, n=459), рак желудка (РЖ, n=384), опухоли зародышевых клеток (ОЗК, n=136), рак щитовидной железы (РЩЖ, n=429), тимома (Т, n=118), рак эндометрия (РЭ, n=172), карциносаркома матки (КМ, n=56) и увеальная меланома (УМ, n=78).

При анализе данных больные в каждой выборке были разбиты на группы с относительно низким и относительно высоким уровнем экспрессии гена *PRAME*. Пороговый уровень экспрессии *PRAME* выбирался таким образом, чтобы было получено минимальное значение *p-value*, установленное при сравнении параметров выживаемости лог-ранговым критерием.

Кроме данных о выживаемости больных мы проводили сопоставление активности гена *PRAME* с другими генами, данные о которых были найдены в системе GEPiA.

Для определения наиболее значимого транскрипционного фактора опирались на ряд критериев: область промотора должна распознаваться ДНКазой I; там же должны находиться гистоновые белки с модификациями H3K4Me3 и H3K27Ac; там же должен быть сайт связывания ДНК-зависимой РНК полимеразы II; там же должно находиться наибольшее число сайтов связывания транскрипционных факторов. Для исследования были использованные данные, предоставленные сервисом Genomebrowser.

Этапы эволюции генов семейства *PRAME* оценивались путём сопоставления геномных последовательностей различных представителей класса млекопитающих. Геномные последовательности были получены из баз данных Pubmed и Genomebrowser. Для анализа использовались инструменты Genomebrowser и Vector NTI 9.0.

Культуральные исследования проводились на линиях mel Hn, mel Ibr, mel II, mel Kor, mel Mtp, mel P, mel Si, A875, SK-BR-3, A549 и HCT-116, предоставленных ФГБУ «НМИЦ Онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, и линиях WI-38 и WI-38-PRAME, предоставленных Юлией Павловной Финашутинной и Натальей Александровной Лыжко. Ведение клеточных линий проводилось в среде RPMI-1640 по общепризнанной методике. Исследовалось влияние химиопрепаратов бортезомиб, цисплатин, цитарабин, доксорубицин, мелфалан, циклофосфамид и араноза, а также их сочетаний, на выживаемость клеток. Для анализа комбинированного воздействия химиопрепаратов на выживаемость клеток использовалась формула (1) расчёта комбинаторного индекса (CI) для IC50, выведенная из теоремы Chou-Talalay:

$$CI=(D)_1/(Dx)_1+(D)_2/(Dx)_2+\alpha(D)_1(D)_2/(Dx)_1(Dx)_2\dots \quad (1)$$

Где $(Dx)_1$ – IC50 вещества 1; $(D)1$ – IC50 вещества 1 в комбинации с $(D)_2$; $(Dx)_2$ – IC50 вещества 2; $(D)_2$ – IC50 вещества 2 в комбинации с $(D)_1$; $\alpha=0$ для веществ со взаимоисключающим эффектом и $\alpha=1$ для веществ с дополняющим эффектом. Была синтезирована и испытана молекула PHF8stop, представляющая собой антисенс-РНК для нокаута гена *PHF8*.

Проводились исследования способности к субстрат-независимому росту клеток линий WI-38 и WI-38-PRAME на полутвёрдой среде.

Лабораторные исследования выполнялись для определения уровня экспрессии гена *PRAME* и других генов в клеточных линиях и в образцах опухоли, полученных от больных. Оценка уровня экспрессии проводилась методом ПЦР в реальном времени по общепризнанной методике. Исследования профиля экспрессии генов линий WI-38 и WI-38-PRAME проводилось при помощи микрочипов.

Противоопухолевый эффект мышинных и химерных антител 5D3 и 6H8 против *PRAME* исследовался *in vivo* на мышах линии Balb/c Nu/Nu. Правила кормления, содержания и ухода, и процедуры по рутинному уходу за животными выполнялись в соответствии с СОП НМИЦ Онкологии им Н.Н. Блохина Минздрава России. Ксенографтные модели создавались при помощи прививки клеток линии меланомы человека mel P и меланомы мыши B16F10. Измерение объемов опухолей в трех взаимоперпендикулярных осях два раза в неделю. Объемы определяли по следующей формуле (2):

$$V = (a * b * c) * \pi / 6 \quad (2)$$

Индекс торможения роста опухоли (ТРО) определяли по следующей формуле (3):

$$\text{ТРО (\%)} = (VK - VP) / VK * 100 \quad (3)$$

где VK и VP – средний объем опухоли в контрольной группе и группе препарата соответственно.

Исследовались клинико-лабораторные характеристики больных с диагнозами ФЛ ($n=34$), Т-кЛ ($n=36$), множественная миелома (ММ, $n=77$). Для этих больных проводилось сопоставление уровня экспрессии *PRAME* с данными о локализации опухоли, стадии, клиническом исходе, эффективности терапии, выживаемости и другими параметрами.

Для статистических исследований применялись критерии χ^2 , корреляционный анализ Пирсона, критерий Манна-Уитни, критерий Уилкоксона для парных измерений, медианный тест, лог-ранговый критерий, а также методы построения линейной регрессионной модели и кластерный анализ. Перечисленные критерии и методы применялись только при наличии необходимых условий. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,1$ для больных Т-клеточными лимфомами, при $p < 0,2 \cdot 10^{-5}$ для исследований, выполненных при помощи микрочипов и при $p < 0,05$ для всех остальных исследований.

Результаты исследования

Установлено, что группа генов *PRAME* человека объединяет следующих представителей – *LRRC14*, *LRRC14b*, собственно *PRAME*, *PRAME-NP*, *PRAME-X*, *PRAME-F*. При проведении биоинформатического анализа нами был открыт не описанный никем ранее ген *PRAME-PRIM*, который также относится к семейству генов *PRAME*. Сопоставление геномных последовательностей показало, что все гены семейства произошли от гена *LRRC14* путём его транспозирования в другие локусы, эволюционной изменчивости, и, в некоторых случаях, дубликации. Ввиду того, что семейство генов *PRAME* достаточно молодо, другие гены, находящиеся в непосредственной близости от них, эволюционно старше. Благодаря этому, они использовались в качестве маркеров, которые позволили провести более точную систематизацию генов семейства *PRAME* у млекопитающих и человека.

Гены *LRRC14* и *LRRC14b* могут быть обнаружены в геноме всех млекопитающих, вследствие чего мы предполагаем, что более 165 миллионов лет назад у общего предка млекопитающих произошло транспозирование *LRRC14*, которое привело к формированию гена *LRRC14b*. Активность *LRRC14b* регулируется транскрипционными факторами CTCF и BORIS. Главная особенность, отличающая *LRRC14* и *LRRC14b* от остальных генов семейства *PRAME* – их экспрессия как в соматических, так и половых клетках.

С наибольшей вероятностью гены семейства *PRAME* произошли путём дубликации гена *LRRC14*. Все эволюционно более молодые представители семейства *PRAME* унаследовали сайты для связывания с транскрипционным фактором CTCF.

Ген *PRAME* человека и плацентарных млекопитающих расположен на хромосоме 22, в локусе, кодирующем фрагменты гена иммуноглобулина λ . Перед 5'-концом *PRAME* расположен ген *LOC108491837*, гены, кодирующие РНК 63 и miP-650, а также сайт, распознающийся транспозазой. Далее по хромосоме, за 3'-концом *PRAME*, расположены гены *ZNF280a* и *ZNF280b* (Рисунок 1).

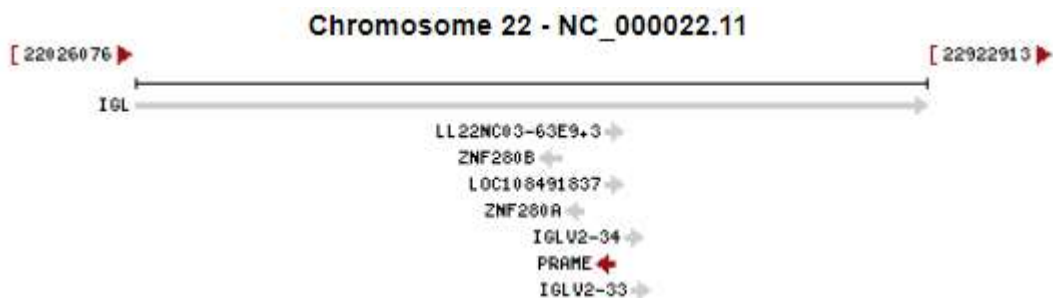


Рисунок 1 – Схема локуса гена *PRAME* человека

В результате сплайсинга 5'-конца формируется множество вариантов матричных РНК гена *PRAME*. Эти изоформы позволяют синтезировать два белка – длиной 509 и 493 а.о. Длинная (509 а.о.) форма белка *PRAME* имеет неизвестные функции. Выполненное нами 3d-моделирование показало, что стехиометрия не позволяет ей участвовать в убиквитинировании, так как белок такого размера просто не помещается в комплекс *CUL2*. С другой стороны, изоформа *PRAME* длиной 493 а.о. образует комплекс свободно, вследствие чего

именно она отвечает за убиквитинирование субстратов при посредничестве системы CUL2.

У человека локус длиной 775 мб, содержащий 36 генов *PRAME-F*, расположен на хромосоме 1. Все гены группы *PRAME-F* человека произошли путём дупликации *PRAME-12F*. Дупликации привели к тому, что гены *PRAME-F* организованы в 4х кластера, каждый из которых ограничен генами гетероядерных нуклеопротеинов *HNRNPC*. Перед 5'-концом каждого гена *PRAME-F* расположен ген длиной некодирующей РНК, длиной 460 нуклеотидов.

Маркером, позволяющим определить гены *PRAME-NP*, который расположен часто на той же хромосоме, что *PRAME*, являются гены *VPREB1* и *TOP3b*. В окрестности *PRAME-NP* отсутствуют *ZNFs*. Из первого интрона в «+» цепи экспрессируется слайсируемая длинная некодирующая РНК *LL22NC03-23C6.13*, а также присутствует ген, кодирующий миР-130с-2.

PRAME-X. Гены *PRAME-X* расположены на X-хромосоме. Маркеры для нахождения *PRAME-X* гены *BEX5* и *TCP11X2*.

PRAME-PRIM. Наши исследования позволили установить наличие ещё одной группы генов, гомологичных *PRAME*. Так как эти гены присутствуют только у высших обезьян, мы дали им название *PRAME-PRIM*. Данные гены не обнаружены у мартишек и лемуруров. Возможно, *PRAME-PRIM* произошли от одного из генов группы *PRAME-F*. Маркеры *PRAME-PRIM* – гены *GJA8* и *GJA5*, кодирующие белки-коннексины, которые предназначены для формирования щелевых контактов между двумя соседними клетками (Рисунок 2). В зоне рядом с *PRAME-prim* расположено более 10 генов, кодирующих микроРНК, причем уже зрелых, несплайсируемых.

Гены *PRAME-PRIM* содержат 3 экзона и 2 интрона. Экспрессируются в коре надпочечников. Кодировать мРНК и белок длиной 382 а.о. с неизвестными функциями. Так же, как и все другие гены семейства *PRAME*, регулируется эпигенетически транскрипционными факторами CTCF и CTCFL. *PRAME-PRIM* человека расположен на хромосоме 1. Точные координаты – 147.840.952-147.842.497.

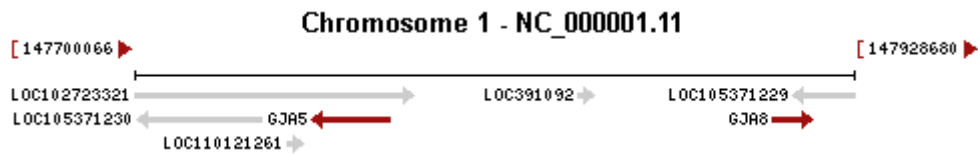


Рисунок 2 – Схема локуса, содержащего гены *PRAME-PRIM* человека

Гены, гомологичные *PRAME*, во всех случаях обладают значительно меньшим уровнем экспрессии и имеют сопоставимую структуру промоторной зоны. По этой причине методы, останавливающие экспрессию гена *PRAME*, могут предотвратить экспрессию и его гомологов. Таким образом, задачу блокирования экспрессии генов семейства *PRAME* можно решить при помощи единственного фактора.

Определив состав семейства генов *PRAME*, мы исследовали возможности по инактивации их экспрессии. Для этого мы стали искать, какие сигнальные пути и транскрипционные факторы были значимы в регуляции экспрессии *PRAME*.

Согласно нашим наблюдениям, при добавлении к *PRAME*-гиперэкспрессирующей линии меланомы A875 цисплатина в концентрации 20 мкг/мл часть клеток погибает в течение суток, а уровень экспрессии гена *PRAME* в выживших клетках значительно увеличивается. Уровень экспрессии *PRAME* в выживших клетках превосходил значения, наблюдаемые в контроле, приблизительно в 8 раз, что было статистически значимо ($p=0,0277$).

При инкубировании линии A875 в течение суток с бортезомибом в концентрации 10 мкг/мл наблюдали гибель 24% клеток. Уровень экспрессии гена *PRAME* при этом вырос статистически незначимо ($p=0,1158$). В случае, когда концентрация бортезомиба составляла 0,4 мкг/мл, активность *PRAME* практически не изменилась.

В следующей серии экспериментов были оценены эффекты комбинации бортезомиба и цисплатина. Добавление цисплатина в концентрации 20 мкг/мл и бортезомиба в концентрации 10 мкг/мл в культуральную среду привело к гибели 69% клеток через 24 часа инкубирования. Активность *PRAME* при этом составила 22130% по отношению к гену *ABL*, что было примерно в 4 раза выше по сравнению с контролем, но статистически значимо ниже по сравнению с

воздействием цисплатина в монорежиме ($p=0,0303$). После инкубации клеток линии A875 с цисплатином в концентрации 25 мкг/мл и бортезомибом в концентрации 0,4 мкг/мл активность гена *PRAME* была несколько ниже, чем после инкубации только с цисплатином (Таблица 1).

Таблица 1 – Активность гена *PRAME* в клетках A875 при различных условиях

Тип воздействия	Уровень экспрессии <i>PRAME</i> в % относительно <i>ABL</i>	Сравнение с контролем, p
Контроль	5308	-
Цисплатин, 20 мкг/мл	42900	0,0277
Бортезомиб, 10 мкг/мл	6990	0,1158
Бортезомиб, 0,4 мкг/мл	6372	0,2864
Дексаметазон, 100 мкг/мл	44941	0,0277
Цисплатин, 20 мкг/мл + Бортезомиб, 10 мкг/мл	22130	0,0277
Цисплатин, 20 мкг/мл + Бортезомиб, 0,4 мкг/мл	21080	0,0464
Цисплатин, 20 мкг/мл + Дексаметазон, 100 мкг/мл	84260	0,0277
Лизат клеток	21680	0,0277

Мы ожидали, что добавление дексаметазона снизит активность гена *PRAME*. После инкубации клеток A875 с дексаметазоном уровень экспрессии *PRAME* увеличился по сравнению с контролем ($p=0,0277$). Скорость пролиферации клеток в присутствии дексаметазона увеличилась.

При добавлении смеси дексаметазона и цисплатина в среду уровень экспрессии *PRAME* вырос примерно в 16 раз по сравнению с контролем. При этом погибло значимо меньше клеток ($p=0,0277$).

Увеличение уровня экспрессии *PRAME* происходило также при добавлении к живым клеткам A875 лизата, полученного из тех же клеток путём последовательного замораживания и оттаивания. Наши результаты свидетельствуют, что активность *PRAME* в опухолевых клетках значительно увеличивается в условиях стресса, вызванного воздействием цисплатина, и появления в культуральной среде DAMPs – молекул, ассоциированных с повреждением. При добавлении в среду бортезомиба активность *PRAME* практически не менялась. Так как бортезомиб известен как ингибитор провоспалительного сигнального пути NF- κ B, мы можем сделать вывод, что данный сигнальный путь имеет большое значение в регуляции экспрессии гена *PRAME*. Это наблюдение хорошо согласуется с данными о канцерогенной роли процессов воспаления. В контексте этого можно предположить, что воспаление, связанное с опухолью, поддерживает активность провоспалительных сигнальных путей в опухолевой клетке, и это стимулирует активность гена *PRAME*. Получившийся в результате белок *PRAME* увеличивает жизнеспособность опухолевой клетки, и делает саму опухоль более резистентной к различным воздействиям. Наблюдение за бортезомиб-опосредованным блокированием экспрессии *PRAME* показывает, что данный препарат может иметь перспективы в лечении больных.

Определив сигнальный путь, активирующий *PRAME*, мы, тем не менее, не обладали знаниями о ключевом транскрипционном факторе, регулирующем экспрессию этого гена. Упомянутые ранее белки CTCF и BORIS способны моделировать структуру промотора, делая её более доступной для сборки транскрипционного комплекса. Однако ни CTCF, ни BORIS сами не формируют таких комплексов, и не могут считаться ключевыми активаторами *PRAME*.

Исследуя структуру промоторной области *PRAME*, мы обнаружили места для посадки транскрипционных факторов POLR2A, CTCF1, PHF8, CHD2, POU2F2 и ZNF263. Фактор PHF8 представлял особый интерес для изучения. Хотя *PHF8* не относится к раково-тестикулярным генам, для него характерна спонтанная гиперэкспрессии в опухолях, в частности при раке печени, ОЛЛ взрослых,

колоректальном раке, раке лёгких и многих других. В целом, *PRAME* и *PHF8* обладают сопоставимым профилем экспрессии. Более того, в ряде заболеваний *PHF8* связан с прогрессией и эпителиально-мезенхимальным переходом.

При исследовании уровня экспрессии генов *PRAME*, *CTCF1*, *CHD2*, *PHF8*, *MYD88*, *CVID12* и *CVID10* в клеточных линиях меланомы mel Hn, mel Ibr, mel II, mel Kor, mel Mtp, mel P, mel Si и A875 было установлено, что активность *PRAME* коррелирует с уровнем экспрессии *PHF8* ($p=0,0021$) и не коррелирует с уровнем экспрессии *CTCF1*, *CHD2*, *MYD88*, *CVID12* и *CVID10* (Рисунок 3, $p>0,05$ для всех остальных случаев).

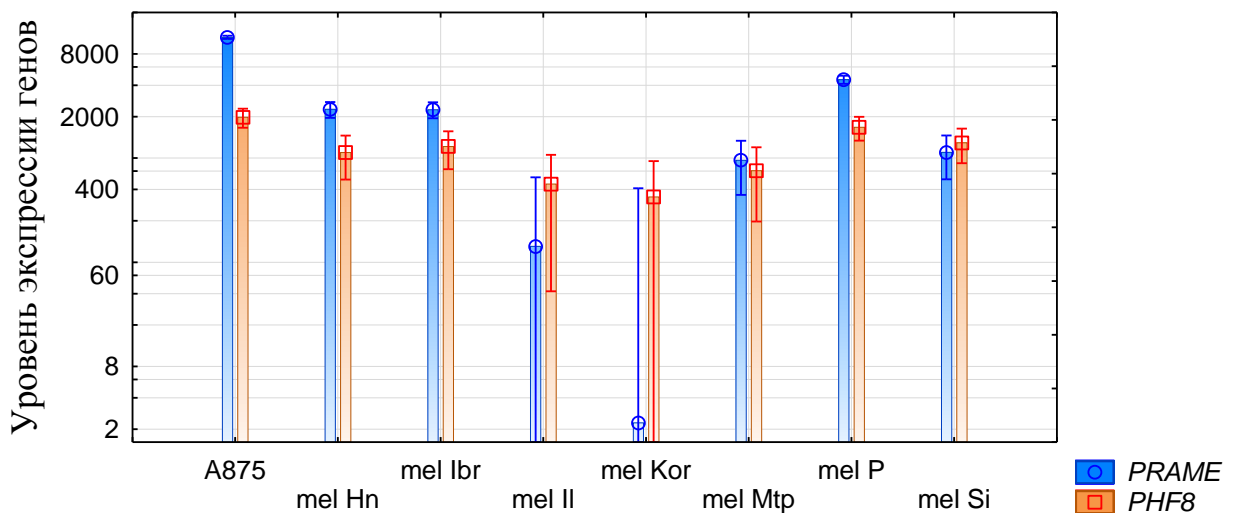


Рисунок 3 – Активность генов *PRAME* и *PHF8* в клетках различных линий меланомы

Таким образом, при в клетках меланомы транскрипционный фактор *PHF8* показал положительную корреляцию с экспрессией *PRAME*, что подтверждает предположение о *PHF8*-опосредованной регуляции экспрессии *PRAME*.

Для подтверждения этого мы создали антисмысловый тиопроизводный олигонуклеотид с последовательностью GACGATAGCGCAGCTCCTATTCATT, названному нами *PHF8stop*. Особенности этого олигонуклеотида позволяли ингибировать мРНК *PHF8*. Мы ожидали, что при воздействии *PHF8stop* снизится не только активность *PHF8*, но и активность гена *PRAME*.

Мы проводили инкубацию *PHF8stop* в различных концентрациях в среде, содержащей клетки меланомы A875, в течение суток. Воздействие *PHF8stop*

дозозависимо снижало уровень экспрессии целевого гена *PHF8* (Рисунок 4, $p < 0,0001$). Вместе с *PHF8* наблюдалось снижение уровня экспрессии гена *PRAME*.

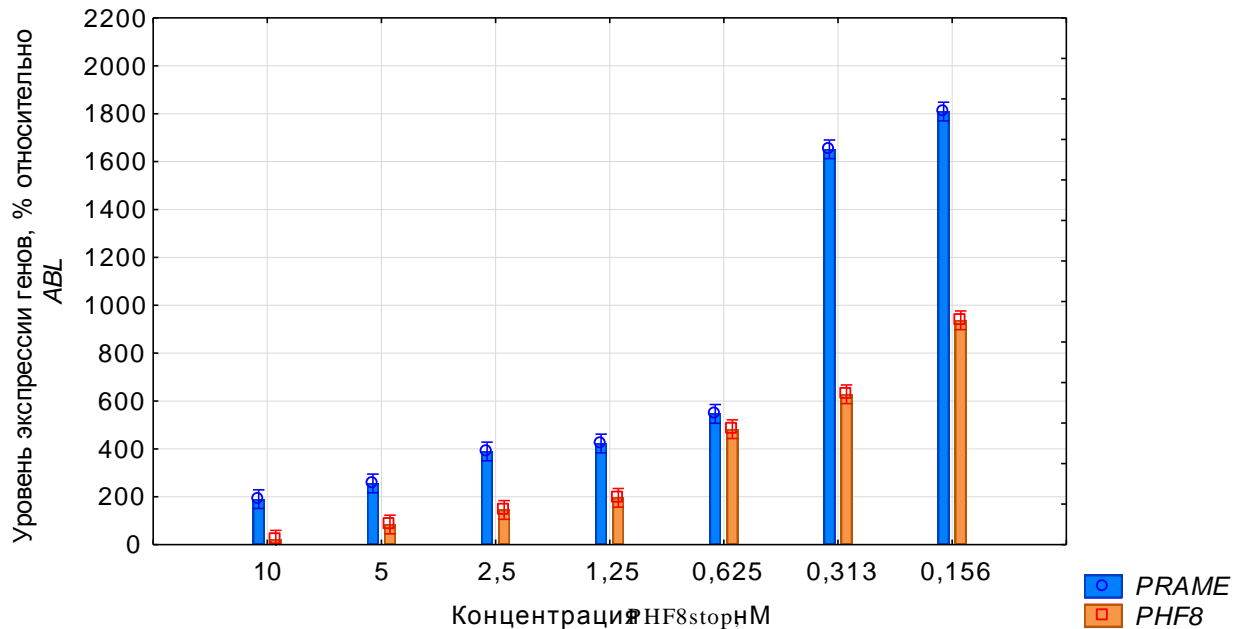


Рисунок 4 – Активность генов *PHF8* и *PRAME* в клетках A875 после инкубирования с PHF8stop

Таким образом, мы собрали ряд доказательств PHF8-опосредованной регуляции экспрессии *PRAME*. Созданный нами олигонуклеотид PHF8stop может использоваться в будущем как агент, снижающий активность *PRAME*.

Определив особенности регуляции экспрессии, мы перешли к исследованию последствий экспрессии гена *PRAME*. Для этого мы сопоставили профиль экспрессии генов в клетках линии WI-38-vector и в клетках линии WI-38-PRAME, в которые был трансфицирован вектор для экспрессии гена *PRAME*. Помимо этого, мы сравнили скорость пролиферации этих клеток, способность к субстрат-независимому росту, а также резистентность к химиопрепаратам.

По сравнению с линией WI-38-vector, трансфицированной вектором без *PRAME*, скорость пролиферации WI-38-PRAME удвоилась ($p=0,0304$).

По данным микрочипов, активность *PRAME* оказала влияние на множество генов, в особенности на *RAB2*, *SP110*, *G1P3*, *MAGEA12*, *MAGEA6*, *MAGEA3*, *EST*, *STAT1*, *ACTINB*, *EMP2*, *MAD2*. Приводим также информацию о различных генах,

активность которых, согласно данным литературы, меняется в случае изменения уровня экспрессии гена *PRAME* (Таблица 2).

Таблица 2 – Влияние трансфекции гена *PRAME* на активность других генов в линии WI-38. Граничное значение *p-value*, принятое с учётом поправки Бонферрони, составляет $6,2 \cdot 10^{-6}$

Ген	Функции кодируемого белка	Изменение уровня экспрессии относительно контроля	P
<i>RAB2A</i>	Передача сигнала по RAS-зависимому пути	2,26	$2,3 \cdot 10^{-8}$
<i>SP110</i>	Активатор транскрипции	2,27	$2,1 \cdot 10^{-8}$
<i>GIP3</i>	Блокирование апоптоза	2,69	$1,1 \cdot 10^{-9}$
<i>MAGE A12</i>	Антиген меланомы	4,36	$4,6 \cdot 10^{-9}$
<i>MAGE A6</i>	Антиген меланомы	4,14	$6,2 \cdot 10^{-9}$
<i>MAGE A3</i>	Антиген меланомы	4,86	$1,4 \cdot 10^{-10}$
<i>STAT1</i>	Передача сигнала по STAT-зависимому пути	3,65	$9,5 \cdot 10^{-8}$
<i>ACTB</i>	Актин, компонент цитоскелета	2,07	$5,8 \cdot 10^{-8}$
<i>EMP2</i>	Активатор апоптоза	0,49	$2,5 \cdot 10^{-8}$
<i>MAD2L1</i>	Активатор апоптоза	0,48	$4,6 \cdot 10^{-8}$
<i>S100A4</i>	Повышение мобильности	0,81	$9,7 \cdot 10^{-5}$
<i>P21</i>	Супрессор перехода в фазу G1 клеточного цикла	1,13	$3,0 \cdot 10^{-5}$
<i>P27</i>	Супрессор перехода в фазу G1 клеточного цикла	0,7	$3,1 \cdot 10^{-5}$
<i>RARβ</i>	Активатор клеточной дифференцировки β	0,79	$3,1 \cdot 10^{-4}$

Трансфекция генами-репортёрами активности факторов NF-kB и AP1 показала, что в клетках линии WI-38-PRAME данные молекулы более активны по сравнению с родительской линией ($p < 0,05$ для обоих факторов, Рисунок 5).

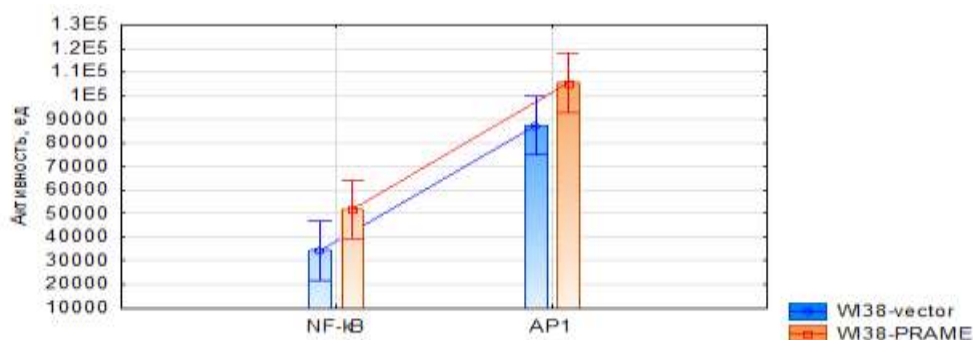


Рисунок 5 – Активность NF-kB и AP1 в клетках WI-38

На следующем этапе исследования мы провели сопоставление скорости роста линий клеток WI-38-vector и WI-38-PRAME в культуральной среде с низким содержанием сыворотки. Согласно данным, полученным методом МТТ, снижение содержания сыворотки прямо коррелировало со снижением скорости роста клеток. Пониженное количество сыворотки оказывало статистически значимо меньшее влияние на скорость роста линии WI-38-PRAME по сравнению с линией WI-38-vector. Скорость роста клеток линии WI-38-vector была тем меньшей, чем меньше сыворотки находилось в культуральной среде ($p < 0,00001$, Рисунок 6).

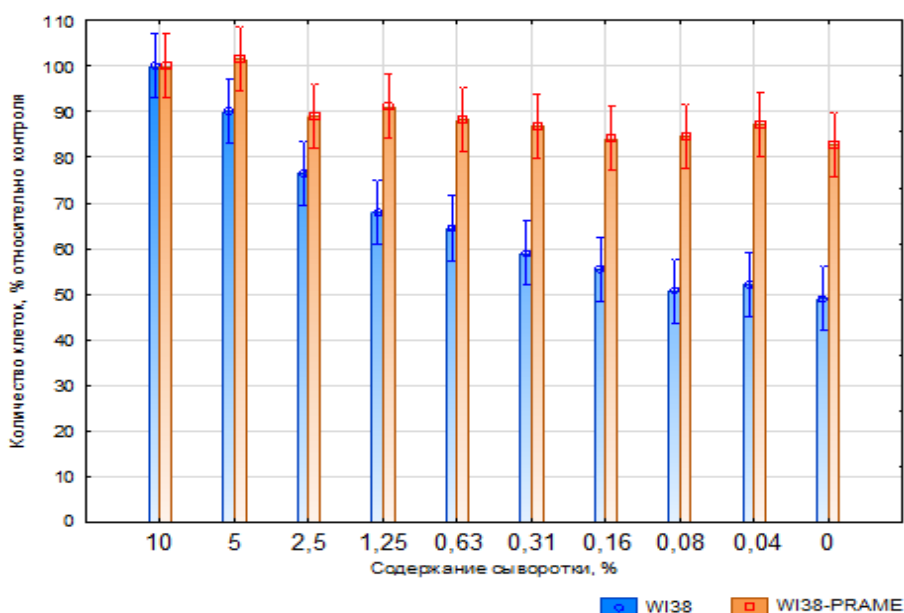


Рисунок 6 – Рост клеток линий W38-vector и WI-38-PRAME в среде без сыворотки в течение трёх суток (данные МТТ-теста)

В независимом эксперименте проводили сравнение скорости роста клеток линий WI-38-vector и WI-38-PRAME в реальном времени на системе xCELLigence (ACEA Biosciences, США). Мы наблюдали значительную разницу в скорости роста данных линий в среде, содержащей 5% сыворотки. Клетки линии WI-38-PRAME росли быстрее, чем клетки WI-38-vector ($p < 0,00001$, Рисунки 7).

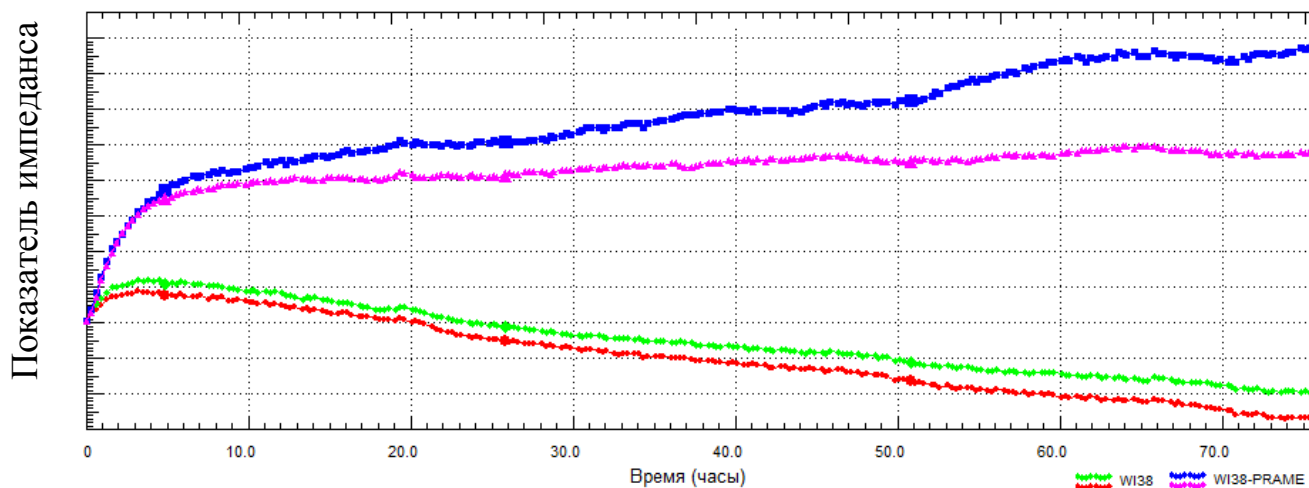


Рисунок 7 – Рост клеток линий W38-vector и WI-38-PRAME в среде, содержащей 5% сыворотки в течение трёх суток (данные xCELLigence)

Способность клеток линий WI-38-vector и WI-38-PRAME формировать колонии в полутвёрдой среде также различалась. Клетки линии WI-38-PRAME выживали в статистически значимо большем числе по сравнению с клетками WI-38, и формировали колонии (Рисунки 8-10).

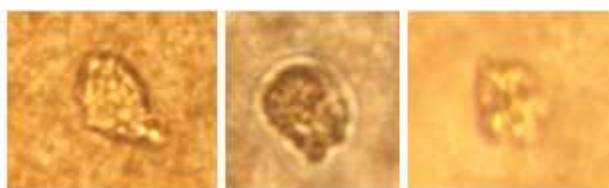


Рисунок 8 – Единичные клетки WI-38-vector в агарозе

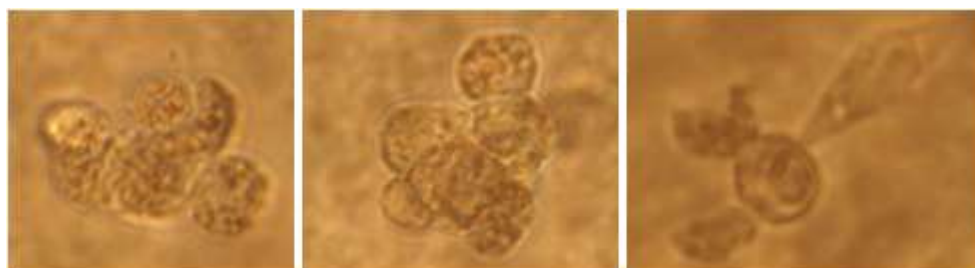


Рисунок 9 – Колонии клеток WI-38-PRAME в агарозе

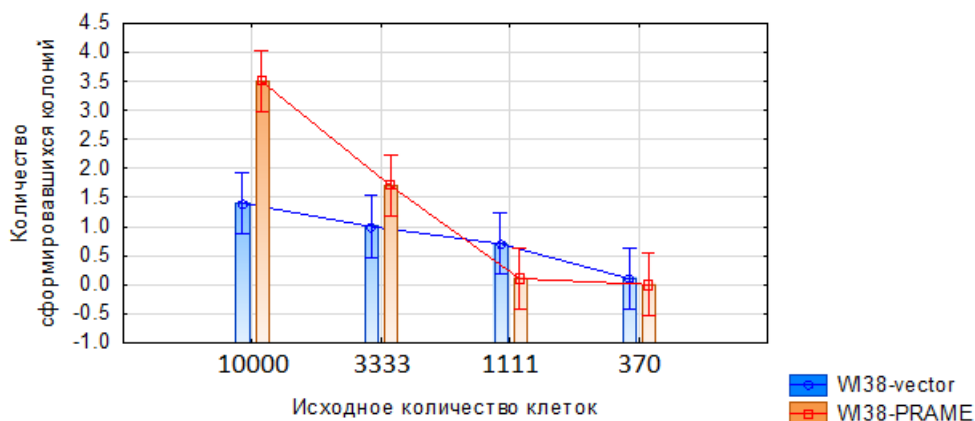


Рисунок 10 – Сопоставление числа колоний линий WI-38-vector и WI-38-PRAME, выросших в полутвёрдой среде

Экспрессия *PRAME* также повлияла на чувствительность линии клеток WI-38 к химиопрепаратам. Методом МТТ были получены данные IC₅₀ цисплатина, цитарабина, доксорубицина, винкристина, мелфалана, циклофосфида и бортезомиба для линий WI-38-vector и WI-38-PRAME. Клетки WI-38-PRAME обладали меньшей чувствительностью ко всем химиопрепаратам ($p < 0,02$ для каждого из них), за исключением винкристина ($p = 0,0117$, Рисунок 11).

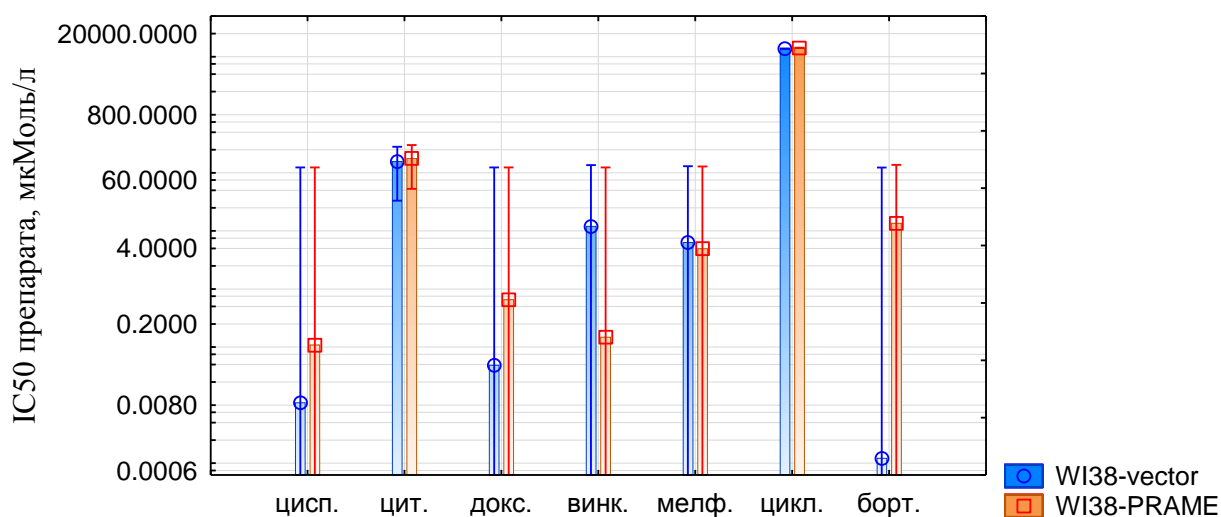


Рисунок 11 – IC₅₀ химиопрепаратов для WI-38-vector и WI-38-PRAME

Полученные результаты свидетельствуют о *PRAME*-опосредованном увеличении скорости пролиферации клеток WI-38, о придании этим клеткам способности к пролиферации в условиях дефицита ростовых факторов и резистентности к цисплатину, цитарабину, доксорубицину, циклофосфамиду и

бортезомибу. Всё это объясняется глубокими изменениями в профиле экспрессии генов, вызванными в клетках WI-38 после запуска экспрессии в них *PRAME*. В основном увеличивается активность генов, опосредующих пролиферацию, уменьшение чувствительности к апоптозу, а также генов группы *MAGE*, которые сами по себе названы драйверами канцерогенеза.

Мы собрали дополнительные свидетельства участи гена *PRAME* в формировании химиорезистентности. Для проведения данного эксперимента была получена химиорезистентная линия mel MeR. Выведение химиорезистентной линии проводили посредством нескольких этапов селекции клеток в среде с аранозой. Полученная клеточная линия была резистентной не только к аранозе, но и к стрептозотоцину и цисплатину.

Кроме химиорезистентности, mel MeR обладала значительно более высоким уровнем экспрессии гена *PRAME* (313%) по сравнению с линией mel Me (94%). В экспериментах по преодолению лекарственной резистентности был испытан перспективный цитостатик – ЛХС1269. После преинкубирования линии mel MeR в течение 30 минут с ЛХС1269 в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л и добавления в среду аранозы в IC50 наблюдали гибель 13% через 24 ч и 30% клеток через 48 ч. Без преинкубации с ЛХС1269 в процессе апоптоза находилось не более 7% клеток (Рисунок 12).

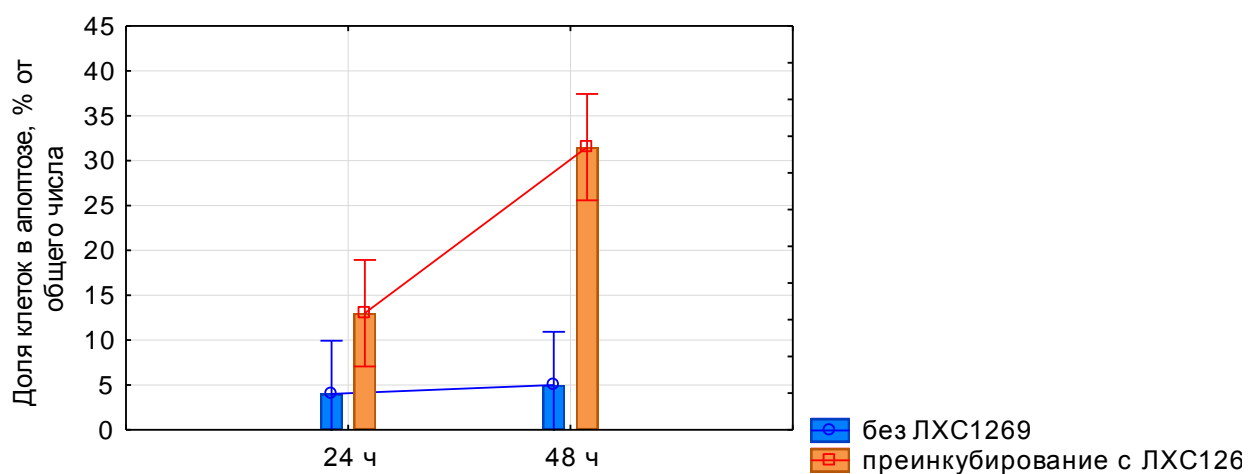


Рисунок 12 – Преинкубация клеток mel MeR с ЛХС1269 в течение двух суток

Согласно данным ПЦР, уровень экспрессии *PRAME* через 4 ч инкубирования с ЛХС1269 составил 9,47%, и через 18 ч – 75,79% (Рисунок 13).

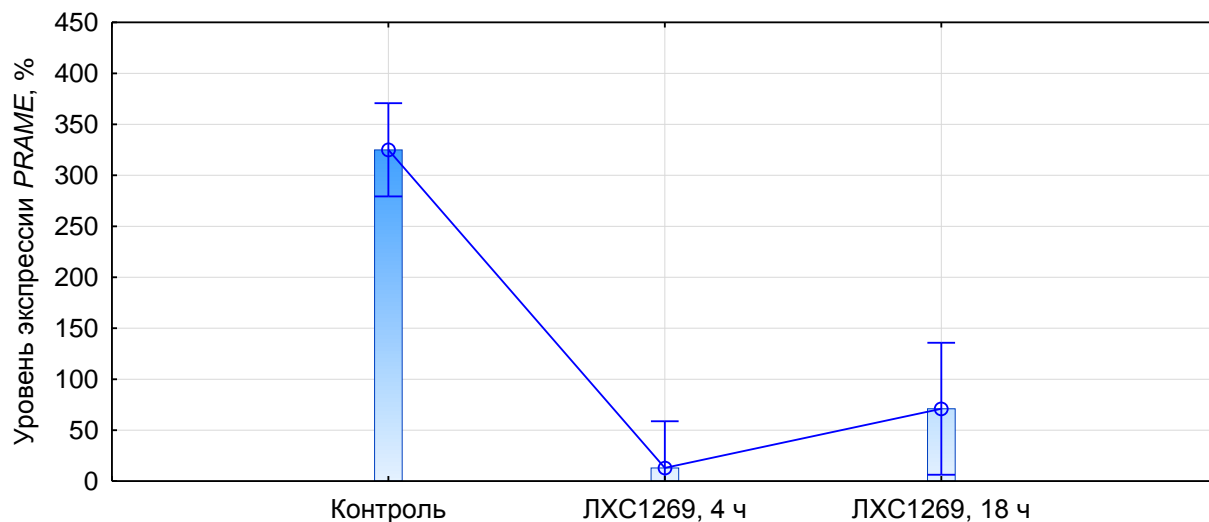


Рисунок 13 – Активность *PRAME* в *mel MeR*, инкубированных с ЛХС1269

Таким образом, в полученной резистентной линии *mel MeR* уровень экспрессии гена *PRAME* был очень высоким. Преинкубирование линии *mel MeR* с ЛХС1269 приводило к снижению уровня экспрессии *PRAME* и увеличению чувствительности клеток к аранозе, стрептозотоцину и цисплатину.

Полученные данные свидетельствует о драйверных свойствах белка *PRAME*. При учёте драйверности не удивительно, что активность *PRAME* прямо связана с неблагоприятным клиническим исходом у больных онкологическими заболеваниями, о чём и сообщалось в ряде исследований. Мы оценили прогностическую значимость экспрессии *PRAME* при разных локализациях. Проведённый анализ позволил получить характеристики ОВ в зависимости от уровня экспрессии *PRAME*.

Согласно нашим наблюдениям, высокий уровень экспрессии *PRAME* статистически значимо связан с ухудшением параметров ОВ у больных АКР, РМЖ, РТК, ПРГШ, ПРК, СККП, АЛ, АКПЖ, МК и КМ. При ХК и УМ высокий уровень экспрессии *PRAME* связан с тенденцией к ухудшению параметров ОВ.

Установлено также, что высокий уровень экспрессии *PRAME* связан со статистически значимым улучшением параметров ОВ у больных ПРЛ, МП и КМ.

У больных с диагнозами ОМЛ и СЦАК наблюдался тенденция к улучшению ОВ в случае высокого уровня экспрессии *PRAME* (Таблица 3).

Таблица 3 – Общая выживаемость больных в зависимости от уровня экспрессии гена *PRAME*. н/д – медиана выживаемости не достигнута

Заболевание	Гипер- эксп- рессия <i>PRAME</i> , 2х- летняя ОВ, %	Низкий уровень эксп- рессии <i>PRAME</i> , 2х- летняя ОВ, %	Гипер- эксп- рессия <i>PRAME</i> , медиана ОВ, мес.	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , медиана ОВ, мес.	Групп- повой cut-off, %	р
АКР, n=77	66	86	58	н/д	65	0,011
РМП, n=400	52	63	26	41	55	0,33
РМЖ, n=1066	92	96	121	142	55	0,018
АКШМ, n=292	77	86	97	н/д	50	0,18
ХК, n=36	27	73	22	46	65	0,072
РТК, n=270	78	86	64	96	60	0,047
ДБКЛ, n=46	77	89	124	221	70	0,13
РП, n=182	58	55	28	27	50	0,43
МГ, n=156	18	28	19	19	50	0,42
ПРГШ, n=518	57	70	33	73	70	0,00061
ХРП, n=58	88	100	н/д	н/д	50	0,1
ПРП, n=517	78	88	69	н/д	60	0,00011
СККП, n=283	80	91	99	н/д	80	0,041
ОМЛ, n=106	64	53	55	26	65	0,094
ГГМ, n=514	80	88	72	97	65	0,079
ГЦР, n=354	67	76	47	71	55	0,058

Заболевание	Гипер-экспрессия <i>PRAME</i> , 2х-летняя ОБ, %	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , 2х-летняя ОБ, %	Гипер-экспрессия <i>PRAME</i> , медиана ОБ, мес.	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , медиана ОБ, мес.	Групповой cut-off, %	p
АЛ, n=476	72	77	44	60	35	0,044
ПРЛ, n=383	73	58	50	43	40	0,042
МП, n=81	61	28	28	16	60	0,0088
СЦАК, n=425	78	72	50	43	45	0,065
АКПЖ, n=178	29	52	59	н/д	65	0,04
РПЖ, n=469	98	96	121	н/д	45	0,67
КР, n=90	90	78	59	н/д	55	0,59
СМТ, n=256	73	78	65	81	50	0,27
МК, n=459	76	86	68	104	35	0,031
РЖ, n=384	53	60	27	47	50	0,41
ОЗК, n=136	97	96	н/д	н/д	50	0,49
РЦЖ, n=429	98	99	н/д	н/д	50	0,92
Т, n=118	96	99	н/д	н/д	50	0,53
РЭ, n=172	87	87	112	н/д	50	0,17
КМ, n=56	63	32	51	19	35	0,016
УМ, n=78	81	86	47	53	45	0,082

Анализ паттерна экспрессии генов показал, что в тех случаях, когда заболевание имеет неблагоприятный прогноз, рассчитанный по параметрам выживаемости в зависимости от уровня экспрессии *PRAME*, с наибольшей частотой наблюдается его коэкспрессия вместе с *ADAMTS2*, *CTAG2*, *FAM69B*, *FAR2P2* и

MAGEA2B. Гены *DUSP9*, *KIF25-AS1*, *MAGEA9*, *MAGEA9B*, *RNASEH1P1*, *RP11-505E24.2* и *SPATA31C1* коэкспрессируются с *PRAME* при тех заболеваниях, когда активность *PRAME* связана с большим временем ОБ и БСВ. В случаях, когда не было выявлено какой-либо корреляции между экспрессией *PRAME* и параметрами выживаемости, выявлялась экспрессия других генов – *LL22NC03-63E9.3*, *MAGEF1*, *MAGEA9*, *SALL2*, *SLC6A10P* *ZNF280A*, *ZNF280B* и *ZNF74*.

Более подробные данные были доступны для больных ФЛ. На основании анализа данных о больных ФЛ у большинства из них (22/26) выявлена генерализованная (III–IV) стадия заболевания по классификации Ann-Arbor, у 4/26 – I–II стадия. Более чем в половине случаев поражённые лимфатические узлы образовывали конгломераты – 12/22 (55%). Поражение костного мозга выявлено у значительной доли больных – 18/32 (56%). Опухолевая популяция клеток ФЛ в периферической крови (лейкемизация ФЛ) определялась у 6 (21%) из 29 больных.

Активность гена *PRAME* хотя бы в одном из исследованных биологических образцов обнаруживалась у 22 (64%) из 34 больных. Наиболее часто экспрессия гена *PRAME* выявлялась при исследовании лимфатических узлов в сравнении с образцами крови или костного мозга. Величина экспрессии данного гена была наибольшей в опухолевых лимфатических узлах, по сравнению с кровью ($p=0,0437$) и костным мозгом ($p=0,0186$). В 2 из 8 реактивных лимфатических узлов, составлявших группу контроля, отмечалась экспрессия *PRAME*, однако величина экспрессии была значительно более низкой по сравнению с лимфатическими узлами, поражёнными ФЛ ($p=0,0368$). В контрольных образцах крови и костного мозга экспрессия *PRAME* не выявлялась.

В образцах периферической крови также была обнаружена экспрессия гена *PRAME* ($p=0,0357$). Отмечена статистически значимая связь экспрессии гена *PRAME* с наличием вовлечения костного мозга, подтвержденного гистологическим исследованием ($p=0,0034$).

С помощью уравнений множественной линейной регрессии была выявлена прямая связь экспрессии *PRAME* в лимфатическом узле с более высокими значениями индекса пролиферативной активности Ki67, что отражает более

агрессивное клиническое течение заболевания в случае активности гена *PRAME* в опухолевых клетках ФЛ ($p=0,043$).

Медиана срока наблюдения составила 29 месяцев (6–53 мес.). Общая выживаемость была значимо ниже в группе больных с экспрессией гена *PRAME* в лимфоузле на уровне более 5% (*PRAME*^{high}, $n=7$) по сравнению с больными, уровень экспрессии *PRAME* у которых не превышал 5% (группа *PRAME*^{low}, $n=11$), $p=0,0402$, (Рисунок 14).

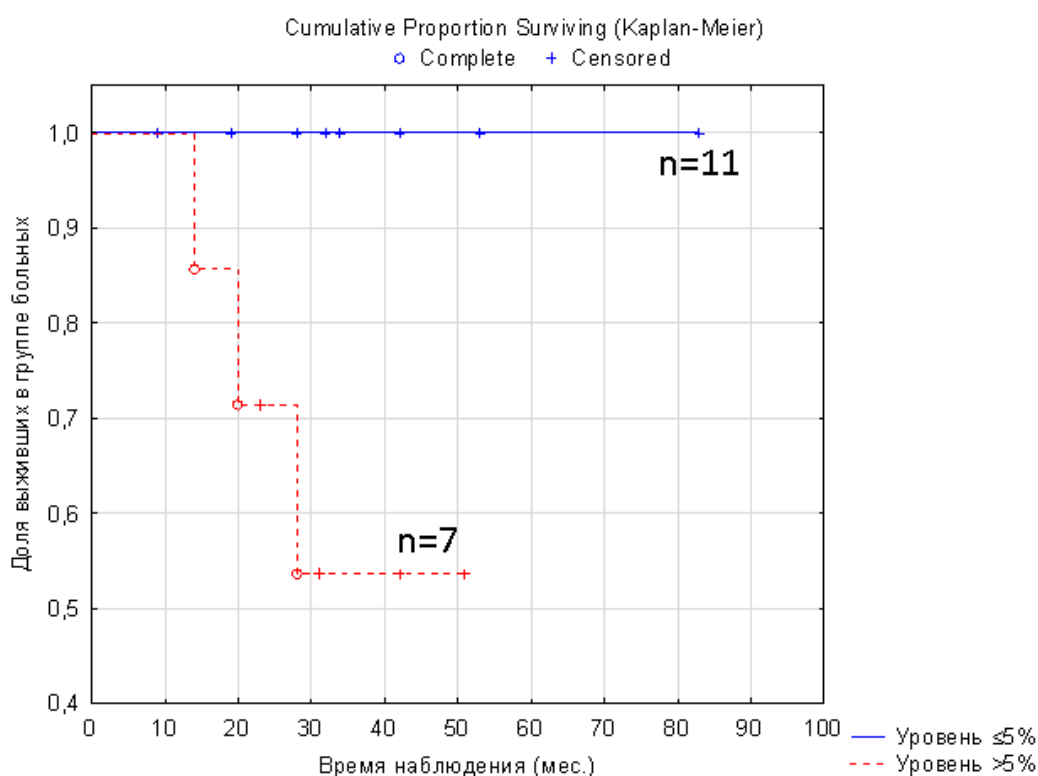


Рисунок 14 – Общая выживаемость больных ФЛ с различным уровнем экспрессии гена *PRAME* в лимфатических узлах ($p=0,0402$)

Мы сопоставили между собой клинические признаки, которые учитываются при определении значения индексов FLIPI-1 и FLIPI-2, у больных в группах *PRAME*^{low} и *PRAME*^{high}.

Указанные группы больных не различались по признакам, включенным в данные прогностические индексы, кроме общего числа зон поражения. У больных из группы *PRAME*^{high} их количество было значимо выше по сравнению с больными из группы *PRAME*^{low} ($p=0,04$). Различий по общему показателю

индексов FLIPI не наблюдалось, кроме тенденции к значимости, наблюдаемой при определении числа больных, имеющих высокий риск по FLIPI-1 ($p=0,0876$).

Кластерный анализ показал, что параметры FLIPI и значения уровня экспрессии *PRAME* выше или ниже 5% порога имеют несколько сочетаний (Рисунок 15). В кластер 1 были объединены больные, которые имеют промежуточный риск согласно FLIPI-1/FLIPI-2 и различный (от нулевого до очень высокого) уровень экспрессии *PRAME*. Кластер 2 – больные могут находиться в группе неблагоприятного риска по FLIPI-1/FLIPI-2, но иметь относительно низкий либо нулевой уровень экспрессии *PRAME*.

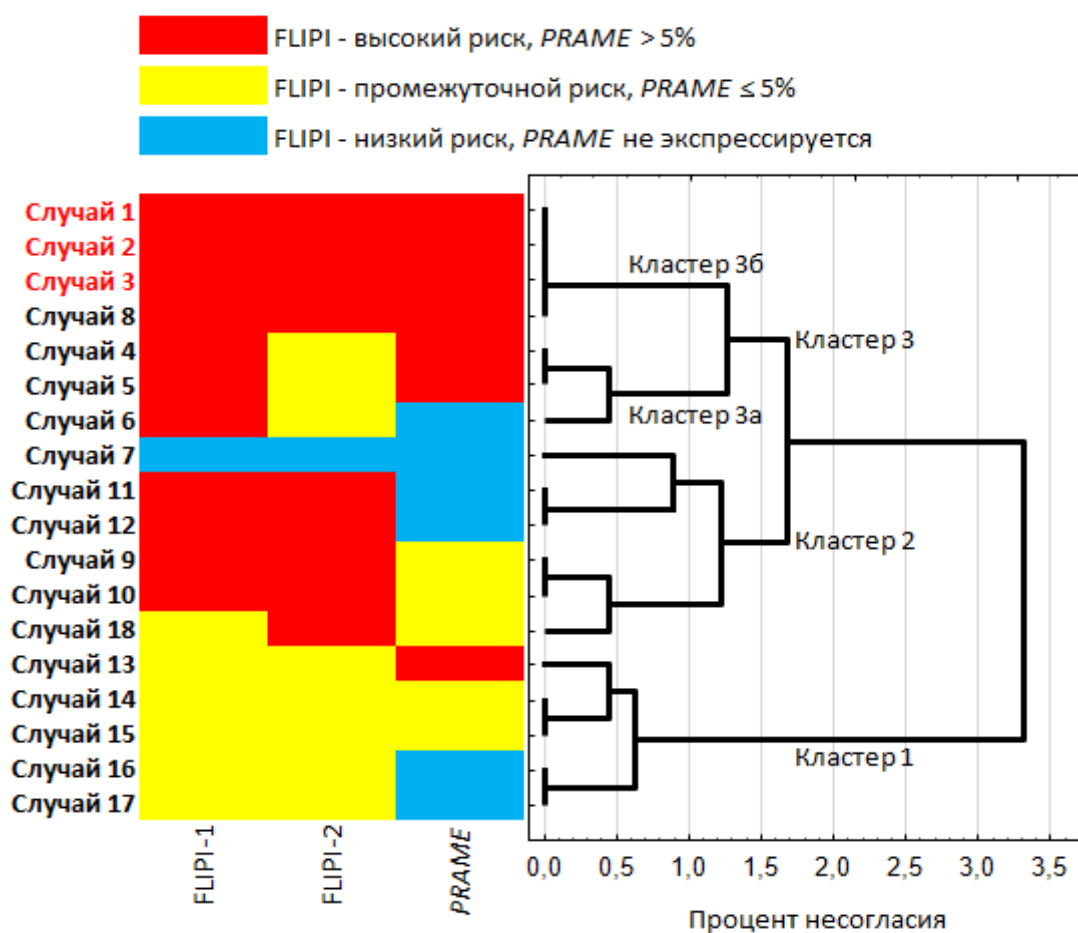


Рисунок 15 – Кластерный анализ данных по значениям FLIPI и активности *PRAME*. Красным шрифтом выделены наблюдения с летальным исходом, $n=3$

Кластер 3 разделяется на два подкластера. Кластер 3а – больные имеют неблагоприятный риск по FLIPI-1 или промежуточный риск по FLIPI-2, а также высокий (более 5%) уровень экспрессии *PRAME*, за исключением одного из случаев. В кластере 3б были больные, имеющие неблагоприятный риск по FLIPI-

1/FLIPI-2 и высокий уровень экспрессии гена *PRAME*. Все больные, погибшие в период наблюдения, относились к кластеру 3б.

Таким образом, у больных ФЛ наличие экспрессии гена *PRAME* отражало факт диссеминации заболевания и служило молекулярным маркером опухолевого поражения, а также указывало на высокий риск гибели больного в случае неблагоприятного прогностического риска по шкалам FLIPI-1/FLIPI-2.

Экспрессия *PRAME* обнаружена у 21 из 35 больных Т-кЛ (60%). Медиана экспрессии гена *PRAME* составила 11,66% (0,42%–65,98%) в 9 из 20 образцов крови и 4,59% (0,45%–8,25%) в 6 из 23 образцов костного мозга больных Т-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями (Т-кЛ). В 2 из 8 реактивных лимфатических узлов наблюдалась активность гена *PRAME* (на уровне 0,05% и 1,79%). В поражённых Т-кЛ лимфатических узлах больных активность *PRAME* выявлена в 12 из 14 образцов на уровне 5,83% (0,04%–75,8%), что было значимо больше по сравнению с реактивными образцами ($p=0,0138$). В 3 случаях из 9 экспрессию *PRAME* обнаружили в образцах кожи, инфильтрированной трансформированными Т-клетками. Исследовалась также группа контроля. В образцах крови 12 здоровых добровольцев и костном мозге двух больных с негематологическими заболеваниями активность *PRAME* выявлена не была.

У 4 из 8 больных с гистологически доказанным вовлечением костного мозга выявлялась экспрессия *PRAME*. При отсутствии гистологически доказанного поражения костного мозга Т-кЛ экспрессия *PRAME* в нем не детектировалась. Таким образом, активность *PRAME* в костном мозге была ассоциирована с поражением, подтвержденным с помощью гистологического исследования ($p=0,0289$).

У 8 больных заболевание протекало с лейкоцитозом за счет диссеминации опухоли, у 7 больных – без признаков лейкоцитоза. В 6/8 случаев с лейкоцитозом экспрессировался ген *PRAME* в периферической крови. В одном из 7 случаев без лейкоцитоза также отмечена экспрессия *PRAME* в периферической крови. У данного больного выявлена экспрессия *PRAME* и в лимфатическом узле.

Построение модели линейной регрессии показало прямую зависимость между уровнями экспрессии *PRAME* и Ki-67 ($R^2=0,5399$, $p=0,0155$).

При оценке связи экспрессии *PRAME* в лимфатических узлах с параметрами выживаемости больных Т-кЛ установлено, что экспрессия *PRAME* на уровне выше 10 относительно *ABL* связана с более низкими значениями ОВ ($p=0,0787$, Рисунок 16). БСВ при данном пороговом уровне экспрессии *PRAME* не различалась ($p=0,7185$).

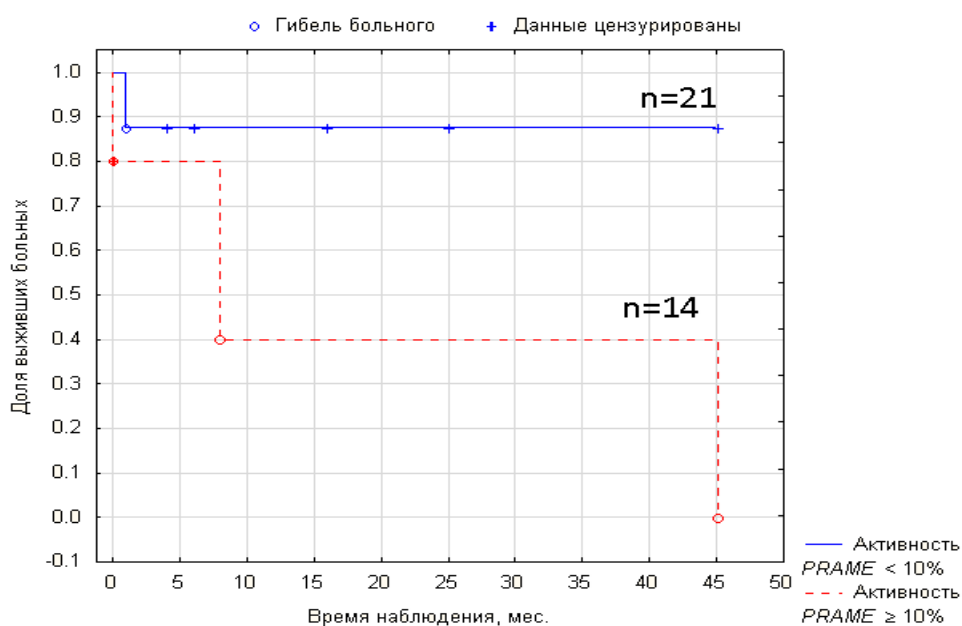


Рисунок 16 – Общая выживаемость больных ФЛ с различным уровнем экспрессии гена *PRAME* в лимфатических узлах

Части больных ($n=9$) была выполнена трансплантация ГСК (аллогенная или аутологичная). В общей группе пациентов показатели общей выживаемости имели тенденцию к статистической значимости в отношении улучшения прогноза заболевания больных Т-кЛ, которым была проведена трансплантация ГСК в сравнении с пациентами без трансплантации ($p=0,0897$). У больных Т-кЛ, прошедших трансплантацию ГСК, у которых экспрессия *PRAME* в биологических образцах не детектировалась, ОВ была несколько выше, чем у больных той же группы, но без выполнения трансплантации ГСК, однако различия не имели статистической значимости ($p=0,2661$). При этом показатели БСВ после трансплантации ГСК оказались значимо лучше, чем без трансплантации в той же

группе больных ($p=0,0452$). У больных Т-кЛ, в образцах которых обнаружена экспрессия *PRAME*, не выявлено значимых различий между группами с и без проведения трансплантации ГСК в отношении показателей ОБ и БСВ ($p=0,2305$ и $p=0,697$, соответственно).

Таким образом, у больных Т-кЛ активность *PRAME* оказалась связана с ухудшением параметров выживаемости, большей пролиферативной активностью клеток опухоли, а также с наличием диссеминированной болезни. При этом выявлена тенденция к ухудшению результативности проведения трансплантации ГСК у больных с экспрессией *PRAME*.

В клетках костного мозга 77 больных ММ была определена экспрессия генов *PRAME*, *MAGEA3*, *MAGEA6* и *MAGEA12*. Поскольку мы обладали данными о коэкспрессии *PRAME* и генов группы *MAGE*, мы сравнили между собой экспрессию РТГ у больных до и после проведения лечения. Уровень экспрессии *PRAME* у больных ММ до лечения был выше, чем у прошедших лечение (Рисунок 17). Протоколы терапии больных включали бортезомиб. Медиана срока наблюдения составила 11 мес. Уровень экспрессии гена *PRAME* не повлиял на параметры ОБ и БСВ у больных ММ ($p>0,8$ для обоих случаев). Таким образом, активность *PRAME* не оказала влияния на течение заболевания у больных ММ.

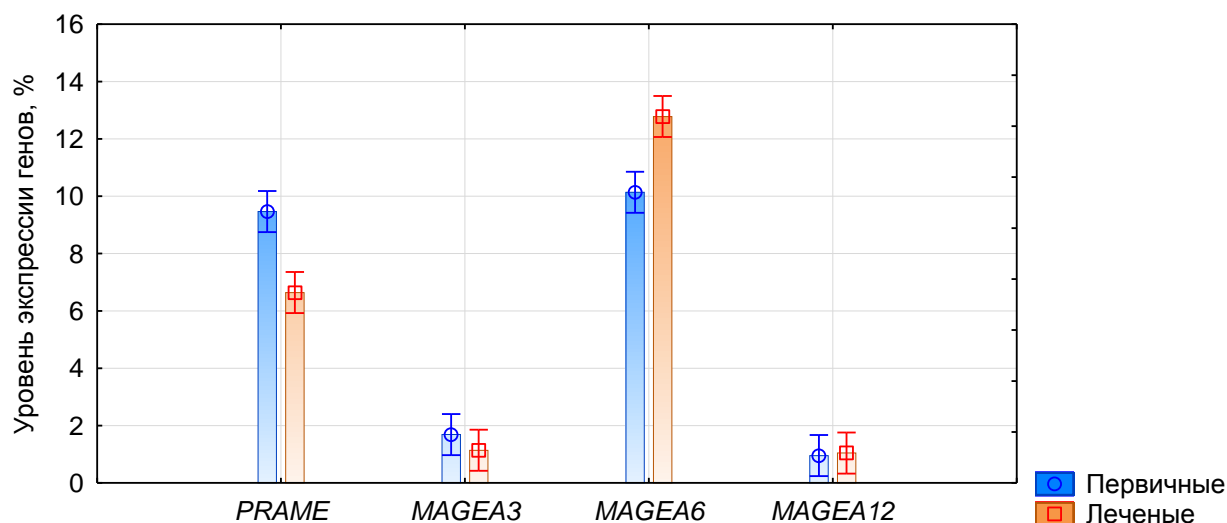


Рисунок 17 – Активность гена *PRAME* и генов группы *MAGE* у первичных и леченых больных ММ

Определив негативную прогностическую значимость экспрессии *PRAME*, мы перешли к разработке подходов *PRAME*-направленной терапии. Данные подходы предназначены для лишения опухолевой клетки преимуществ, которые ей придаёт этот белок. Мы рассмотрели два возможных способа – инактивация гена *PRAME* при помощи антисмыслового олигонуклеотида и блокирование функций белка *PRAME* бортезомибом. Антисмысловой олигонуклеотид PHF8stop был разработан нами ранее для выявления путей активации гена *PRAME*.

PHF8stop в концентрации 1,25 нМ, инкубированный с клетками A875 в течение 24 часов, статистически значимо снижал ($p=0,008$) скорость пролиферации по сравнению с контролем без тиопроизводного и добавлением тиопроизводного TIOrnd, имеющего случайную последовательность (Рисунок 18).

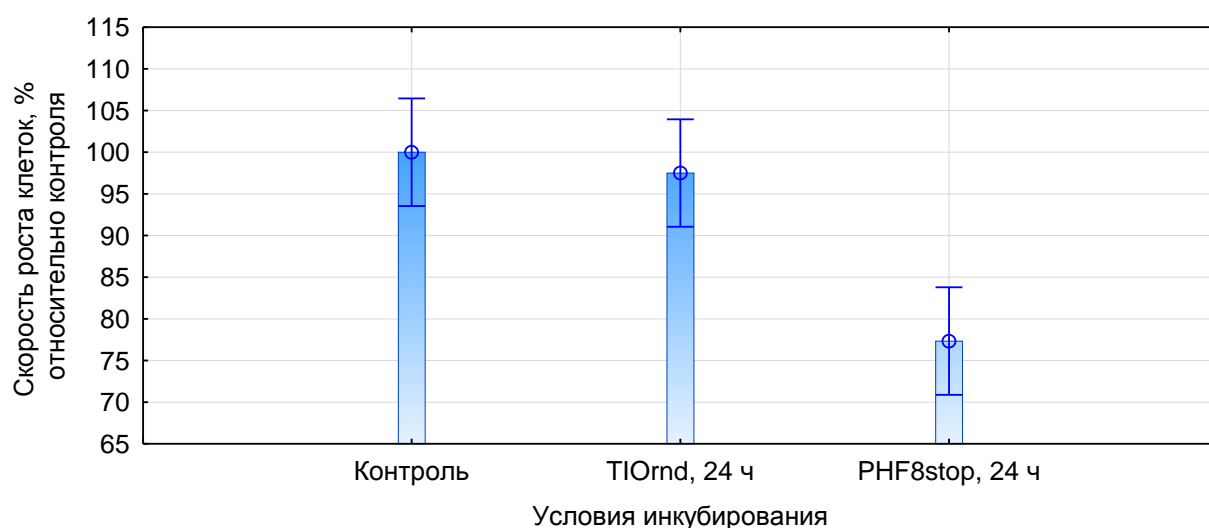


Рисунок 18 – Скорость пролиферации клеток A875 в условиях коинкубирования с PHF8stop

Преинкубирование в течение суток с 1,25 нМ PHF8stop увеличивало чувствительность клеток A875 к цисплатину. IC₅₀ цисплатина при инкубации с клетками A875 в течение трёх суток составляет 12,14 мкМоль. После преинкубации клеток с PHF8stop IC₅₀ цисплатина составила 8,09 мкМоль ($p=0,0031$). Таким образом, блокирование экспрессии *PRAME* в клетках меланомы позволило увеличить их чувствительность к цисплатину.

Возможность использования бортезомиба для *PRAME*-направленной терапии следует из свойств белка *PRAME*. Для выполнения своих функций

PRAME задействует комплекс белков Cul2-убиквитинлигазы и протеасомы. Как показали результаты лечения больных ММ, бортезомиб-опосредованное блокирование протеасом действительно уменьшает влияние экспрессии *PRAME* на прогноз. Для оценки новых перспектив использования бортезомиба мы провели серию экспериментов с различными клеточными линиями, коинкубированными с бортезомибом и другими химиопрепаратами.

Первоначально мы оценивали чувствительность клеточных линий, различающихся как по происхождению, так и по уровню экспрессии *PRAME*, к бортезомибу. Линия A875 – это клетки меланомы, обладающие значительным (от 5834% относительно гена *ABL*) уровнем экспрессии гена *PRAME*. Линия SK-BR-3 выведена из клеток рака молочной железы, и имеет относительно высокий уровень экспрессии *PRAME* – 149% относительно гена *ABL*. Линия клеток рака лёгких A549 имеет относительно средний уровень экспрессии *PRAME* – от 36% относительно гена *ABL*. Наконец, в клетках линии колоректального рака HCT-116 также наблюдался низкий уровень экспрессии *PRAME*, составивший 1,4%. Для сравнения использовались упомянутые ранее линии клеток WI-38 (уровень экспрессии *PRAME* 0,002%) и WI-38-PRAME (уровень экспрессии *PRAME* от 5471%).

Согласно результатам МТТ-теста, проведённому через трое суток после инкубации с бортезомибом, клеточные линии обладают разной чувствительностью к данному препарату (Рисунок 19). Чувствительность клеток WI-38 к бортезомибу была ниже по сравнению с линией WI-38-PRAME.

На следующем этапе изучали синергизм цитотоксического воздействия бортезомиба с одним из противоопухолевых препаратов (цисплатином, цитарабином, доксорубицином, винкристином, мелфаланом и циклофосфамидом). В данных комбинациях бортезомиб использовался в концентрациях, равных уровню IC_{10} .

Результаты МТТ показали, что чувствительность *PRAME*-позитивных клеточных линий к химиопрепаратам в большинстве случаев меняется в зависимости от наличия в среде бортезомиба.

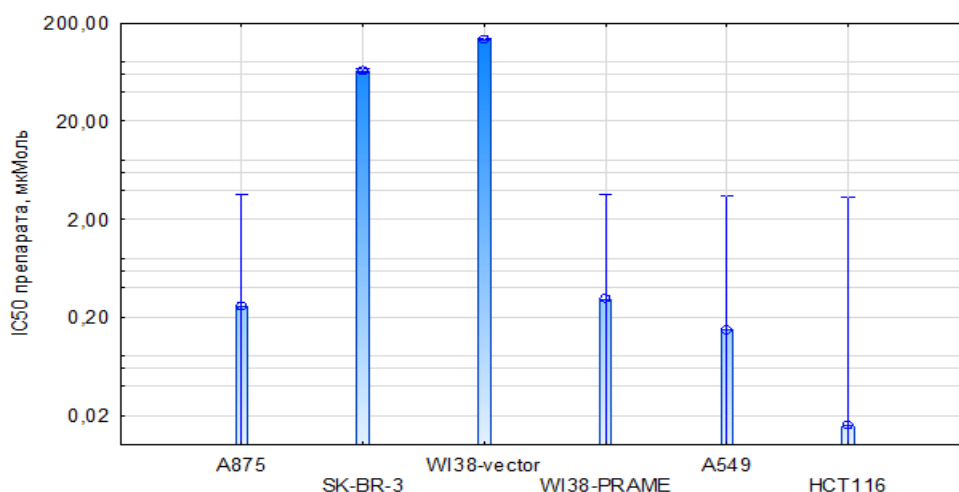


Рисунок 19 – IC₅₀ бортезомиба для клеточных линий различного происхождения. Инкубирование в течение трёх суток

Мы рассчитали комбинаторный индекс для бортезомиба и перечисленных химиопрепаратов для всех исследованных линий (Таблица 4). Показатель в диапазоне от 0,2 до 0,4 соответствует значительному синергизму, 0,4–0,6 – синергизму, 0,6–0,8 – умеренному синергизму, 0,8–0,9 – незначительному синергизму, 0,9–1,1 – аддитивному эффекту, 1,1–1,3 – умеренному антагонизму, и в случае превышения 1,3 – антагонизму. Чем большим уровнем экспрессии гена *PRAME* обладали линии, тем чаще наблюдался значительный синергизм цитотоксического воздействия бортезомиба и химиопрепаратов на эту линию. Исключением оказался винкристин, который ни в одном эксперименте не обладал синергизмом с бортезомибом.

Как в случае опухолевых линий, бортезомиб усиливал цитотоксическое воздействие химиопрепаратов на клетки WI-38-PRAME. На *PRAME*-негативной клеточной линии WI-38 наблюдался антагонизм действия бортезомиба и химиопрепаратов. На *PRAME*-гиперэкспрессирующих линиях опухолей A875 и SKBR-3 все препараты, кроме винкрестина, обладали синергизмом с бортезомибом. На клеточной линии WI-38-PRAME также наблюдался синергизм цитарабин, доксорубицина, мелфалана и циклофосфамида с бортезомибом.

Таблица 4 – Расчёт комбинаторного индекса для бортезомиба и других химиопрепаратов

Химиопрепараты	Исследованные линии клеток					
	A875	SK-BR-3	A549	HCT-116	WI-38-vector	WI-38-PRAME
Цисплатин	0,22	0,70	0,15	2,17	74,69	4,30
Цитарабин	0,20	0,01	0,25	2,53	51,29	0,01
Доскорубицин	0,89	0,02	2,28	1,75	53,49	0,07
Винкристин	6,16	2,77	0,96	3,45	52,36	1,09
Мелфалан	0,62	0,08	1,05	3,06	251,80	0,12
Циклофосфамид	0,20	0,01	1,36	2,78	51,28	0,01

Чем большим уровнем экспрессии гена *PRAME* обладали линии, тем чаще наблюдался значительный синергизм цитотоксического воздействия бортезомиба и химиопрепаратов на эту линию. Как в случае опухолевых линий, бортезомиб усиливал цитотоксическое воздействие химиопрепаратов (всех исследованных, кроме винкристина) на клетки WI-38-PRAME.

Таким образом, величина уровня экспрессии *PRAME* оказалась связана с разной чувствительностью клеточных линий к комбинации химиопрепаратов с бортезомибом. Применение бортезомиба сделало PRAME-гиперэкспрессирующие линии более чувствительными к химиопрепаратам.

Наконец, в завершающей серии экспериментов была оценена противоопухолевая активность созданных нами PRAME-распознающих антител на мышах с привитой PRAME-экспрессирующей опухолью. Мышам линии Balb/c Nu/Nu подкожно прививали полученную нами линию клеток мышинной меланомы B16F10-pCER4, трансфицированных пустым вектором pCER4, либо линию B16F10-pCER4-PRAME, в которую был трансфицирован вектор pCER4 для экспрессии гена *PRAME* человека. Были использованы мышинные PRAME-распознающие антитела 5D3 и 6H8, ранее разработанные нашей группой, и контрольные анти-GAGE антитела 4G1-D2 (Таблица 5).

Таблица 5 – Влияние анти-PRAME антител на рост опухоли B16F10-pSEP4-PRAME у мышей

Вариант опыта	(COO) (мм3) через			Доля мышей с опухолью (%) через			Доля ПМ через 21 сут
	14 сут	18 сут	21 сут	14 сут	18 сут	21 сут	
Контроль	75,5	320	707	80	100	100	20
Интъекции 4G1-D2	7,2 (90)	129 (60)	448 (37)	40	80	100	40
Интъекции 5D3	0 (100)	35 (89)	238 (66)	0	100	100	0
Интъекции 6H8	0 (100)	7,6 (98)	137 (81)	0	100	100	0

Примечание: COO – средний объём опухоли. В графах для «COO» в скобках указаны значения ТРО. ПМ – павшие мыши

Опухоль B16F10-pSEP4-PRAME реагировала на введение мышам антител 5D3 и 6H8, распознающих антиген PRAME. Наименьшую скорость роста по сравнению с контролем без применения антител наблюдали при введении мышам антитела 6H8 ($p=0,0028$), и несколько большую – при введении антител 5D3 ($p=0,0397$). Скорость роста опухоли B16F10-pSEP4-PRAME у мышей, получивших контрольное анти-GAGE антитело 4G1-D2, была статистически незначимо меньшей по сравнению с контролем ($p=0,5762$).

Дополнительно были проведены эксперименты по введению антител мышам Balb/c Nu/Nu с привитой опухолью mel P, экспрессирующей PRAME человека на высоком уровне. В экспериментах использовали химерное антитело 6H8chim, разработанное на базе мышинового антитела 6H8 и предоставленное институтом Боорганической химии им. Шемякина и Овчинникова (Москва) и контрольное CD20-распознающее антитело ритуксимаб (Таблица 6). Во всех случаях отмечалось статистически значимое ТРО по сравнению с группой мышей,

получивших PBS ($p < 0,0001$, Рисунки 65 и 66). ТРО у мышей, получивших мышинные и химерные антитела 6H8, различалась статистически незначимо ($p = 0,8085$).

Таким образом, при введении анти-PRAME антител достигалось торможение скорости роста PRAME-позитивной опухоли не менее чем на 50%.

Таблица 6 – Влияние анти-PRAME антител на рост опухоли B16F10-rSEP4-PRAME у мышей

Вариант опыта	(COO) (мм ³) через			Доля мышей с опухолью (%) через			Доля ПМ через 21 сут
	15 сут	18 сут	22 сут	15 сут	18 сут	22 сут	
Контроль	296	341	471	100	100	100	20
Инъекции ритуксимаба	245 (17)	236 (31)	253 (46)	40	80	100	60
Инъекции 6H8	142 (52)	34 (90)	39 (92)	90	90	90	30
Инъекции 6H8chim	110 (63)	85 (75)	163 (65)	90	90	90	3

ВЫВОДЫ

1. Ген *PRAME* при трансфекции в нормальную клетку WI-38 удваивает её скорость пролиферации ($p=0,0304$), придаёт способность к росту в бессывороточной среде ($p<0,00001$), к субстрат-независимому росту ($p=0,00002$), а также к резистентности к химиопрепаратам цисплатину, цитарабину, доксорубицину, мелфалану, циклофосфамиду и бортезомибу ($p<0,02$ для каждого из химиопрепаратов), что доказывает его драйверные свойства.

2. Высокий уровень экспрессии *PRAME* коррелирует с ухудшением безрецидивной и общей выживаемости при ряде онкологических и онкогематологических заболеваний, имеющих различный гистогенез, что подтверждает драйверные свойства данного белка.

3. Значимым регулятором экспрессии гена *PRAME* является белок PHF8.

4. Нокаут PHF8 в клетках меланомы A875 при помощи антисенс-олигонуклеотидов снижал количество мРНК *PRAME* и увеличивал чувствительность этих клеток к цисплатину ($p=0,0031$).

5. Бортезомиб – высокоселективный обратимый ингибитор активности протеасомы 26S – увеличивает чувствительность *PRAME*-экспрессирующих опухолевых клеток к химиопрепаратам цисплатину, цитарабину, доксорубицину, мелфалану и циклофосфамиду, что позволяет рекомендовать данные комбинации препаратов для терапии больных.

6. Химерные анти-*PRAME* антитела 6H8 способны тормозить рост *PRAME*-экспрессирующих ксенографтов у иммунодефицитных мышей и могут рассматриваться как перспективный таргетный противоопухолевый препарат.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ахлынина, Т.В. Наличие иммуногенного антигена в опухолевой клетке способствует антипролиферативному действию дендритных клеток / Т.В. Ахлынина, А.В. Мисюрин, Н.А. Лыжко, Ю.П. Финашутина, **В.А. Мисюрин**, Е.В. Аксёнова, И.Н. Солдатова, А.П. Шпакова, Б.Б. Хасигова, Т.И. Булычёва, О.С. Бурова // Российский биотерапевтический журнал. — 2014. — Т. 13. — № 4. — С. 23-30.
2. Финашутина, Ю.П. Получение рекомбинантного раково-тестикулярного белка PRAME и моноклональных антител к нему / Ю.П. Финашутина, А.В. Мисюрин, Т.В. Ахлынина, Н.А. Лыжко, А.А. Крутов, Е.В. Аксенова, **В.А. Мисюрин**, А.Ю. Барышников // Российский биотерапевтический журнал. — 2015. — Т. 14. — № 3. — С. 29-36.
3. Лыжко, Н.А. Повышение уровня экспрессия гена PRAME в опухолевых клетках сопровождается локализацией белка в клеточном ядре / Н.А. Лыжко, Т.В. Ахлынина, А.В. Мисюрин, Ю.П. Финашутина, Е.В. Аксенова, И.Н. Солдатова, **В.А. Мисюрин**, А.Ю. Барышников // Российский биотерапевтический журнал. — 2015. — Т. 14. — № 4. — С. 19-30.
4. Лыжко, Н.А. Проявление цитостатического эффекта моноклональных антител к белку PRAME / Н.А. Лыжко, **В.А. Мисюрин**, Ю.П. Финашутина, Т.В. Ахлынина, Л.А. Кесаева, В.В. Тихонова, Н.Н. Касаткина, О.Н. Солопова, М.А. Барышникова, А.В. Мисюрин // Российский биотерапевтический журнал. — 2016. — Т. 15. — № 4. — С. 53-58.
5. Vartanian, A. Inhibitor of vasculogenic mimicry restores sensitivity of resistant melanoma cells to DNA-damaging agents / A. Vartanian, M. Baryshnikova, O. Burova, D. Afanasyeva, **V. Misyurin**, A. Belyavsky, Z. Shprakh // Melanoma research. 2017. — V. 27. — № 1. — P. 8-16.
6. Солодовник, А.А. Экспрессия раково-тестикулярных генов PRAME, NY-ESO1, GAGE1, MAGE A3, MAGE A6, MAGE A12, SSX1, SLLP1, PASD1 у больных множественной миеломой, их влияние на показатели общей выживаемости и скорость возникновения рецидива / А.А. Солодовник, А.С.

Мкртчян, **В.А. Мисюрин**, В.В. Тихонова, Ю.П. Финашутина, Н.Н. Касаткина, О.Н. Солопова, О.М. Вотякова, О.Ю. Якимович, О.М. Володина, М.Ю. Кичигина, Е.Г. Медведовская, А.С. Антипова, И.З. Заводнова, А.А. Семенова, Г.Р. Аракелян, Ю.Е. Рябухина, О.А. Коломейцев, А.Д. Ширин, Е.А. Османов, А.В. Мисюрин // Успехи молекулярной онкологии. — 2018. — Т. 5. — № 2. — С. 62-70.

7. Захаров, С.Г. Экспрессия основных генов внешнего пути апоптоза у больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом в сравнении с клиническими данными / С.Г. Захаров, А.К. Голенков, А.В. Мисюрин, Е.В. Катаева, А.А. Рудакова, М.А. Барышникова, Т.А. Митина, Е.В. Трифонова, Л.Л. Высоцкая, Ю.Б. Черных, Е.Ф. Клинушкина, К.А. Белоусов, Ю.П. Финашутина, **В.А. Мисюрин** // Российский биотерапевтический журнал. — 2018. — Т. 17. — № 2. — С. 41-46.

8. Финашутина, Ю.П. Иммунизация рекомбинантным белком PRAME замедляет рост PRAME-экспрессирующей опухоли у мышей / Ю.П. Финашутина, Н.А. Лыжко, Н.Н. Касаткина, Л.А. Кесаева, В.В. Тихонова, **В.А. Мисюрин**, М.А. Барышникова, А.В. Мисюрин // Российский биотерапевтический журнал. — 2018. — Т. 17. — № 3. — С. 36-43.

9. **Мисюрин, В.А.** Проблема химиорезистентности PRAME-экспрессирующей клетки меланомы и способ ее преодоления с помощью бортезомиба / **В.А. Мисюрин**, Д.В. Калениченко, А.А. Рудакова, Ю.П. Финашутина, Н.А. Лыжко, В.В. Тихонова, Л.А. Кесаева, О.Н. Солопова, А.Е. Мисюрина, А.Н. Великанов, М.А. Барышникова, А.В. Мисюрин // Успехи молекулярной онкологии. — 2018. — Т. 5. — № 4. — С. 131-134.

10. Вартамян, А.А. Резистентные к вемурафенибу клетки меланомы приобретают свойства мезенхимальных стволовых клеток / А.А. Вартамян, О.С. Бурова, Х.С. Вишнякова, И.В. Самойленко, **В.А. Мисюрин**, Е.Е. Егоров, О.О. Рябая, М.А. Барышникова // Успехи молекулярной онкологии. — 2019. — Т. 6. № 4. С. — 47-57.